昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，September 2007，50(9)：878－882　ISSN 0454-6296

中华蜜蜂精子介导 *egfp* 基因转移

郭冬生[1,2]，孙亮先[3]，曾志将[1,*]，张巧利[4]

（1. 江西农业大学动物科技学院，南昌 330045；2. 宜春学院生命科学与环境资源学院，江西宜春 336000；
3. 泉州师范学院模式生物研究中心，福建泉州 362000；4. 天津农学院，天津 300384）

摘要：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是一种真社会性昆虫，也是我国重要的经济昆虫。本实验目的是为了检测精子是否可以作为载体将外源 *egfp* 基因介导转入中华蜜蜂。首先将雄蜂精子与线性化的质粒 DNA 共浴，然后通过人工授精技术将精子导入处女王，再对实验蜂群后代进行分析。结果显示 EGFP 蛋白在一群实验组蜂的 1～2 日龄小幼虫中表达较强，能检测到 0.01%～0.02% 荧光阳性小幼虫个体；通过 PCR 和 RT-PCR 技术分析，证实转入的外源 *egfp* 基因获得表达。实验结果表明精子载体法能够用于中华蜜蜂外源基因的转移和表达。

关键词：中华蜜蜂；精子；基因转移；*egfp* 基因；精子载体法；人工授精

中图分类号：Q966　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296(2007)09-0878-05

Sperm-mediated *egfp* gene transfer in the Chinese honeybee，*Apis cerana cerana* (Hymenoptera：Apidae)

GUO Dong-Sheng[1,2]，SUN Liang-Xian[3]，ZENG Zhi-Jiang[1,*]，ZHANG Qiao-Li[4] (1. College of Animal Science and Technology，Jiangxi Agricultural University，Nanchang 330045，China；2. College of Life Sciences and Environment Resource，Yichun University，Yichun，Jiangxi 336000，China；3. Model Organism Research Center，Quanzhou Normal University，Quanzhou，Fujian 362000，China；4. Tianjin Agricultural College，Tianjin 300384，China)

Abstract：The Chinese honeybee，*Apis cerana cerana* is a eusocial insect and one of the most important economical insects in China. The objective of this study was to transfer the exogenous *egfp* gene through spermatozoa in *A. cerana cerana*. The drone sperms were mixed with foreign linearized DNA，which were then transferred into the oviducts of a virgin honeybee queen with the technique of artificial instrumental insemination. The descendants of the experimental colonies were analyzed. Green fluorescence was observed in 1- to 2-day-old larvae from a colony of the experimental group，and the positive rate was 0.01%－0.02%. PCR amplification of genomic DNA and reverse transcription-polymerase chain reaction confirmed the transfer and expression of *egfp* gene. The results indicate that sperm-mediated transformation can be applicable to transfer and express exogenous genes in *A. cerana cerana*.

Key words：*Apis cerana cerana*；sperm；gene transfer；*egfp* gene；sperm-mediated transformation；artificial instrumental insemination

蜜蜂是一种重要的经济昆虫，已作为研究系统论、行为生态学、神经学和老龄学的生物模式（Robinson *et al*.，2005），其转基因研究具有十分重要的意义。而外源基因导入的成熟方法体系构建，一直是蜜蜂转基因研究中急需解决的课题（Robinson *et al*.，2004）。在蜜蜂转基因研究时，通常的显微注射法难以操作，原因是蜜蜂的卵和幼虫由工蜂哺育，一旦被发现受伤或异常，就会被工蜂清理（Robinson *et al*.，2000）。

精子载体法原理是基于精子细胞具有粘合外源 DNA 的能力，并在受精过程中将其带入卵内（Brackett *et al*.，1971；Atkinson *et al*.，1991）。蜜蜂

基金项目：国家自然科学基金项目（30300183，30560114）

作者简介：郭冬生，男，1972 年 12 月生，江西高安人，博士研究生，主要从事蜜蜂分子生物学研究工作，E-mail：gds960016@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：bees1965@sina.com

收稿日期 Received：2007-02-15；接受日期 Accepted：2007-04-30

精子介导基因转移（sperm-mediated gene transfer，SMGT）是将一定量的雄蜂精子与外源 DNA 共浴后，通过人工授精的方法转入蜂王的输卵管，精子移动到贮精囊中。由于蜜蜂精子具有结合外源 DNA 的能力（Atkinson *et al*.，1991），当精子与卵子结合时紧紧粘在精子表面的外源 DNA 就有可能进入受精卵。应用此方法，Robinson 等（2000）在西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 上成功实现了 *egfp* 基因转移，他们将带 *gfp* 或 *egfp* 基因的质粒线性化，然后与精子共浴，通过人工授精导入蜂王贮精囊，并在人工授精的蜂王后代中可以检测到外源 DNA，而且能遗传到蜂王第三后代，但并没有验证出外源 DNA 整合到蜜蜂基因组。至目前为止，还未见有关东方蜜蜂 *Apis cerana* F. 外源基因转移的研究报道。鉴于此，我们选择东方蜜蜂指名亚种——中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 作为研究对象，以 *egfp* 为报告基因，来探讨中华蜜蜂精子介导基因转移技术的可行性。

1　材料与方法

1.1　实验蜜蜂

蜜蜂来自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂，人工授精使用的蜂王在无王群里培育、饲养直到人工授精，使用的成熟雄蜂来自蜂场其他蜂群。

1.2　主要试剂、质粒和工具酶

含报告基因 *egfp* 的质粒 pEGFP-N1 和大肠杆菌菌株 DH5α 由泉州师范学院模式生物研究中心保存。Trizol、DNA 酶、Taq 酶、蛋白酶 K、限制性内切酶、RevertAid^{TM} first stand cDNA synthesis kit、Generuler^{TM} 100 bp 和 1K bp Marker 等购自深圳晶美公司；TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 为宝生物工程（大连）有限公司产品；其他试剂为国产分析纯。转基因后代 PCR 检测使用的 *egfp*、*Actin* 引物由上海基康生物技术有限公司合成。

1.3　线性质粒 DNA 的制备

将 pEGFP-N1 质粒转化至大肠杆菌 DH5α 菌株中，在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基药物筛选培养，使用碱裂解法提取质粒 DNA，用限制酶 *Eco0109I* 消化质粒使之线性化，经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收线性质粒，然后用 PEG 沉淀法纯化质粒，溶解在已灭菌的含 0.75% NaCl 盐水中，测得浓度 262 ng/μL，－20℃备用。

1.4　精子介导外源基因导入

人工收集新鲜雄蜂精液，1 只处女王人工授精需要 8～15 只性成熟雄蜂精液。把 5 μL 雄蜂精液与 3 μL 线性质粒 DNA 混合 15 min，轻轻混匀，并通过人工授精注入实验组的处女蜂王输卵管中；而对照组处女王通过人工授精仅注入 6 μL 雄蜂精液。人工授精后的蜂王先进行剪翅，放回原贮王笼，待其苏醒后，介绍到无王蜂群中。实验组与对照组介绍的无王蜂群群势相当，授精在室温（23℃～28℃）下进行。

1.5　荧光显微镜观察

分别取实验组和对照组的卵、幼虫、蛹于载波片上，用无菌水小心滴洗幼虫、蛹表面的王浆等杂质，然后置于 Axiovert40 型倒置荧光显微镜（德国蔡司公司）下，观察绿色荧光蛋白是否表达，如有特异性绿色荧光出现表明质粒 pEGFP-N1 已经表达。荧光显微镜使用蓝色滤光片，激发波长 450～490 nm，发射波长 515～565 nm。

1.6　PCR 和 RT-PCR 鉴定

根据 *egfp* 基因序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 2 对引物。上游引物（W1）：5′-CACAAGTTCAGCGTGTCCG-3′，下游引物（W2）：5′-AGTTCACCTTGATGCCGTTC-3′，引物之间的长度为 421 bp；上游引物（W3）：5′-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC-3′，下游引物（W4）：5′-TGCCGTTCTTCTGCTTGTCG-3′，引物之间的长度为 276 bp。根据 GenBank 登录号 的看家基因 *Actin* 序列设计了 1 对引物，上游引物（W5）：5′-TCCTGCTATGTATGTCGC-3′，下游引物（W6）：5′-AGTTGCCATTTCCTGTT-3′，引物之间的长度为 301 bp。

引物 W1 和 W2 用于 PCR 检测，以蜜蜂基因组 DNA 为模板，反应条件为：94℃预变性 4 min，94℃变性 35 s，54℃复性 35 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。3 对引物都用于 RT-PCR 检测，以提取的总 RNA 为模板，用 RT 试剂盒内的寡聚脱氧胸苷酸［Oligo（dT）］为引物进行转录，合成互补 DNA（cDNA），再以 cDNA 为模板，以引物 W1、W2，引物 W3、W4 和引物 W5、W6 分别进行 PCR 扩增。*egfp* 序列的 PCR 反应条件如前所述，*Actin* 的为：94℃ 4 min，94℃变性 30 s，50℃复性 30 s，72℃延伸 35 s，共 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。以上所有 PCR 产物均用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2　结果与分析

2.1　蜂王人工授精效果

实验组一共人工授精了 10 只处女蜂王，其中 5

只蜂王按时产卵，但子脾都不整齐，存在不同程度的花子现象；3 只蜂王死亡；2 只蜂王产卵比正常迟 7 至 8 天，产下的卵都为雄蜂卵，说明人工授精不成功，因此在以后实验中淘汰了这 2 只蜂王。对照组也是人工授精 10 只处女蜂王，其中有 8 只蜂王正常产卵，子脾整齐，另 2 只蜂王死亡。

2.2 荧光检测结果

对照组蜂王所产的幼虫荧光亮点只限于肠道，其他部位未见异常（图 1：A，C，E）；实验组只检测到 1 群蜂中小幼虫（1～2 日龄）除了肠道外，其他部位也出现荧光（图 1：B，D，F），我们称其为阳性群。在阳性群，蜂王开始产卵 1 星期内，能检测到 0.01%～0.02% 荧光阳性小幼虫个体，随着蜂王产卵时间推移，能检测到荧光特异性幼虫个体越来越少，至蜂王开始产卵 4 个星期后，几乎没发现阳性幼虫。同时阳性群中大幼虫和蛹也一直未检测到特异荧光。

2.3 PCR 扩增检测结果

从实验组阳性蜂群分别取 1～2 日龄小幼虫、3～4 日龄大幼虫和蛹，同时从对照组群蜂中取幼虫，参考郭冬生等（2005）方法分别抽提 DNA，以其作为模板使用 W1 和 W2 引物进行 PCR 扩增。由图 2 可见，阳性蜂群中幼虫和蛹都能扩增出导入的 *egfp* 基因片段（421 bp），但对照组蜂群中未扩增出所设计的片段。

2.4 RT-PCR 检测结果

为了证实外源 *egfp* 基因是否表达，对产生荧光的阳性群进行采样，提取 1～2 日龄幼虫（用荧光观察到的阳性个体）、大幼虫和蛹的总 RNA，同时随机

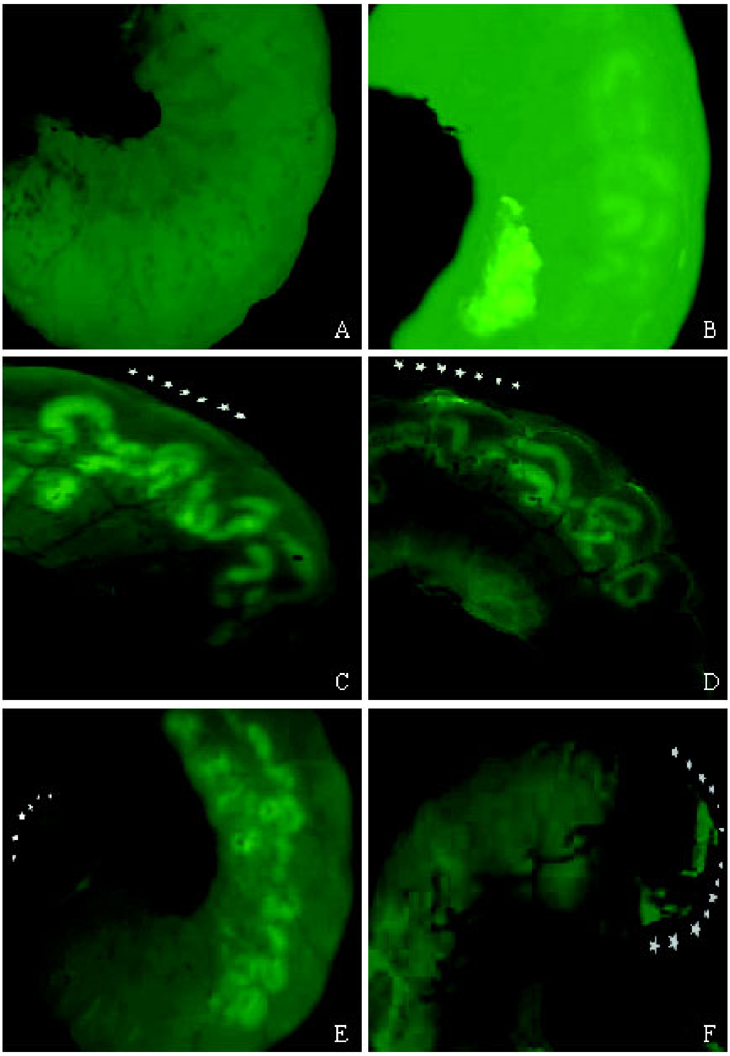

图 1 不同组蜂群中 1～2 日龄幼虫荧光观察图（100×）

Fig. 1 Fluorescence imaging of 1- to 2-day-old larvae from different colonies (100×)

A：对照组 1 日龄幼虫 1-day-old larva of a negative control colony；B：实验组 1 日龄阳性幼虫 Positive 1-day-old larva of the positive colony；C，E：对照组 2 日龄幼虫 2-day-old larva of a negative control colony；D，F：实验组 2 日龄阳性幼虫 Positive 2-day-old larva of the positive colony.

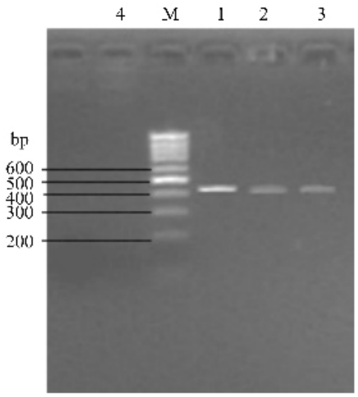

图 2　蜜蜂后代基因组 DNA PCR 扩增结果

Fig. 2　PCR amplification of genomic DNA

M：100 bp 分子量标准 Marker；1,2,3：阳性群的 1～2 日龄幼虫、3～4 日龄幼虫和蛹 1－2-day-old larvae，3－4-day-old larvae and pupae of the positive colony；4：对照组蜂群中的幼虫 Larvae of the negative control colony.

取对照组蜂群中幼虫来提取 RNA 作阴性对照，通过 RT-PCR 来检验 *egfp* 转录本，结果见图 3～5。为了避免假阳性问题，实验采用了 *egfp* 序列的两对引物进行 PCR，分别扩增出了 401 bp 和 276 bp 两条目的片段，表明外源基因 *egfp* 在阳性群中获得表达。从图 3 和图 4 可见，阳性群中 1～2 日龄幼虫扩增条带最亮，表达丰度最高，大幼虫条带次之，而蛹逆转录信号常检测不出或者偶尔出现条带；而阴性对照组没有逆转录信号。图 5 则表明各样品均能扩出看家基因 *Actin* 目的片段(301 bp)。

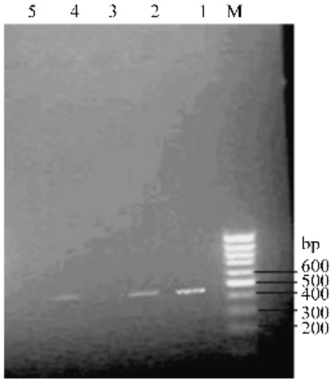

图 3　EGFP 表达 RT-PCR 分析(W1、W2)

Fig. 3　RT-PCR analysis of EGFP expression with W1/W2 primers

M：100 bp 分子量标准 Marker；1,2：阳性群 1～2 日龄幼虫和 3～4 日龄幼虫 1－2-day-old and 3－4-day-old larvae of the positive colony；3,4：阳性群蛹 Pupae of the positive colony；5：阴性对照组中幼虫 Larvae of the control colony.

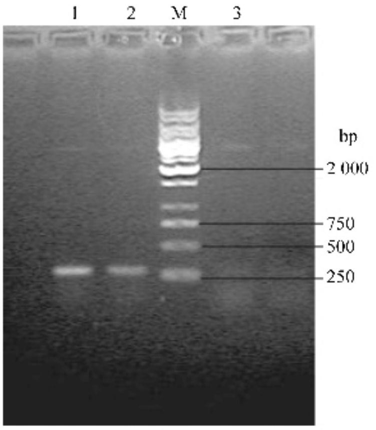

图 4　EGFP 表达 RT-PCR 分析(W3、W4)

Fig. 4　RT-PCR analysis of EGFP expression with W3/W4 primers

M：1 000 bp 分子量标准 Marker；1,2：阳性群 1～2 日龄幼虫和 3～4 日龄幼虫 1－2-day-old and 3－4-day-old larvae of the positive colony；3：对照组中幼虫 Larvae of the control colony.

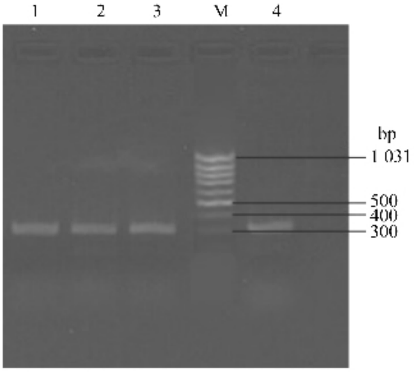

图 5　Actin 作为内参扩增图(W5、W6)

Fig. 5　Actin was amplified as a loading control with W5/W6 primers

M：100 bp 分子量标准 Marker；1,2,3：阳性群 1～2 日龄幼虫、3～4 日龄幼虫和蛹 1－2-day-old，3－4-day-old larvae and pupae of the positive colony；4：阴性对照组中幼虫 Larvae of the control colony.

3　讨论

本实验首次利用精子介导法研究了中华蜜蜂外源基因转移。在荧光显微镜下能观察到带特异荧光的 1～2 日龄幼虫个体，通过对后代的 PCR 扩增可以检测到质粒 DNA 的片段，同时 RT-PCR 分析结果表明转导的外源基因获得表达，这些实验结果说明用线性化 DNA 与雄蜂精液混合，然后通过蜂王人工授精可以将外源基因导入中华蜜蜂幼虫个体中。虽然本实验没有证实外源基因已整合到蜜蜂基因组中，但最起码表明利用精子载体法，*egfp* 基因能够在中华蜜蜂上瞬期表达。这为中华蜜蜂基因工程育种和以中华蜜蜂为生物反应器生产目的蛋白提供理论和基础资料，同时也值得类似昆虫研究借鉴。

在阳性群中，荧光特异性幼虫个体主要在蜂王

开始产卵 1～2 个星期内能观察到，而蜂王开始产卵 4 个星期后，几乎没发现阳性幼虫，这可能是与雄蜂精液混合的线性化 DNA，在贮精囊中会自然地降退。此外在阳性群中大幼虫和蛹上观察不到特异荧光，而 RT-PCR 显示基因有转移，可能是 RT-PCR 检测敏感性更高，大幼虫和蛹中目的基因表达量达不到荧光检测要求，也有可能是大幼虫和蛹丰富的蛋白质和脂肪体对荧光检测的影响。

CMV 启动子控制下的 GFP 或 EGFP 质粒 DNA 已成功在西方蜜蜂（Robinson *et al*.，2000；Kunieda and Kubo，2004）、家蚕（左正宏等，2006）、果蝇（Sinclair，1987；Davis *et al*.，1995）等的基因转移研究中使用。蜜蜂基因组研究刚起步，各种分子技术手段比较落后，目前世界上还没有有关蜜蜂特异强启动子的报道，因此本实验也选用 CMV 作启动子，但结果转基因效率很低（0.01%～0.02%），其原因可能 CMV 启动子在对东方蜜蜂细胞中的启动活性较弱，如能构建东方蜜蜂特异超强启动子，也许外源基因在东方蜜蜂中的表达会明显提高。

利用 *egfp* 作为报告基因，检测时不用破坏蜜蜂样品就可鉴定、筛选出阳性个体。*egfp* 近来用作果蝇、家蚕、蚊子、西方蜜蜂等许多昆虫转基因标记（Jasinskiene *et al*.，1998；Pinkerton *et al*.，2000；Kunieda and Kubo，2004；左正宏等，2006）。实验组蜂群子脾产生‘花子’现象，这说明卵、幼虫或死亡或被工蜂清理；另外实验组蜂群人工授精成功率也远远低于对照组，可能是外源 DNA 溶液对精子活力的影响，也可能是 *egfp* 的伤害（Robinson *et al*.，2000）。

中华蜜蜂是我国的一个特色经济昆虫，是我国宝贵的蜂种资源。中华蜜蜂具有抗螨力强、嗅觉灵敏、善于采集零星蜜源等特性，非常适应山区饲养（杨冠煌，2005）。研究中华蜜蜂遗传操作对我国养蜂业发展具有重要意义，不过要成功使用中华蜜蜂精子介导法实现基因转移，还需解决许多问题，比如外源 DNA 浓度、剂量以及精子活力等对中华蜜蜂精子介导基因转移效率的影响。本实验的结果只能定性说明蜜蜂精子介导法能够转移外源基因载体，可以实现 *egfp* 基因在中华蜜蜂上的瞬期表达。要提高外源基因转移及表达的效率还需要进一步进行实验条件的优化。我们相信，随着精子载体法介导的蜜蜂转基因技术不断地完善和发展，将会使其成为一种高效的蜜蜂转基因手段。

致谢 蜂王的人工授精，得到了吉林省养蜂科学研究所薛运波研究员支持和帮助，在此表示衷心感谢。

参 考 文 献（References）

Atkinson PW，Hines ER，Beaton S，1991. Associations of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa *in vitro*. *Mol*. *Reprod*.，29：1－5.

Brackett BG，Boranska W，Sawicki W，Koprowski H，1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA*，68：353－357.

Davis I，Girdham CH，O'Farrell PH，1995. A nuclear EGFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos：maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Devel*. *Biol*.，170：726－729.

Guo DS，Sun LX，Zhang QL，Zeng ZJ，2005. Simple and rapid method for extracting nucleic acid of honeybee. *Journal of Quanzhou Normal University*，23(4)：85－88.［郭冬生，孙亮先，张巧利，曾志将，2005. 一种高质量蜜蜂核酸的快速提取方法. 泉州师范学院学报，23(4)：85－88］

Jasinskiene N，Coates CJ，Benedict MQ，1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito，*Aedes aegypti*，with the Hermes element from the housefly. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA*，95(7)：3 743－3 747.

Kunieda T，Kubo T，2004. *In vivo* gene transfer into the adult honeybee brain by using electroporation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*，318：25－31.

Pinkerton AC，Michel K，Brochta A，Atkinson PW，2000. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol*. *Biol*.，9：1－10.

Robinson KO，Ferguson HJ，Cobey S，2000. Sperm-mediated transformation of the honey bee，*Apis mellifera*. *Insect Mol*. *Biol*.，9：625－634.

Robinson AS，Franz G，Atkinson PW，2004. Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，34：113－120.

Robinson GE，Grozinger CM，Whitfield CW，2005. Sociogenomics：Social life in molecular terms. *Nat*. *Rev*. *Genet*.，6：257－270.

Sinclair JH，1987. The human cytomegalovirus immediate early gene promoter is a strong promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Res*.，15：2 392.

Yang GH，2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*，48(3)：401－406.［杨冠煌，2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报，48(3)：401－406］

Zuo ZH，Wu CX，Gui MY，2006. Sperm-mediated reporter gene *gfp* and *egfp* transfer in the silkworm. *Journal of Xiamen University*（*Nature Science Edition*），45(4)：580－584.［左正宏，吴春旭，桂慕燕，2006. 家蚕精子介导报告基因 *gfp* 和 *egfp* 转移技术的研究. 厦门大学学报(自然科学版)，45(4)：580－584］

（责任编辑：黄玲巧）